

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL DNA MITOCONDRIAL DEL DELFÍN MULAR (*TURSIOPS TRUNCATUS*) Y CALDERÓN TROPICAL (*GLOBICEPHALA MACRORHYNCHUS*) EN EL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.

Becaria: Ana Navarro y Guerra del Río

INTRODUCCIÓN

En el Archipiélago Canario se han citado hasta el momento 26 especies de cetáceos, lo que representa aproximadamente una tercera parte de las especies que actualmente se conocen en todo el mundo (Martín, 1998), a la vez que ocupa la segunda mundial en cuanto al número de avistamientos se refiere. Los estudios que se han realizado en nuestro archipiélago son debidos a trabajos de censo, fotoidentificación, comportamiento, acústica, etc. y del análisis de animales que han varado en las costas (Escorza *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1992 y 1998; Heimlich-Boran, 1993; Martín & Santiago, 1996; Politi *et al.*, 1996; Ritter, 1996; André, 1997; Martín, 1998).

Desde el punto de vista genético, los estudios son escasos y se han realizado esencialmente en la región control o D-Loop del ADN mitocondrial (Hildebrandt *et al.*, 2001; Hildebrandt, 2002). Sin embargo, tanto en Canarias como en otras regiones del mundo, son pocos los estudios en los que se ha incluido genes con tasas de evolución diferentes a las de la región D-Loop, como son el NADH5 y el COI (Southern *et al.*, 1988; Árnason *et al.*, 1993a).

En el presente trabajo se caracterizan las poblaciones de delfín mular y calderón tropical del Archipiélago Canario, mediante secuenciación de los genes COI y NADH5 del ADN mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron 31 muestras de delfín mular y 21 de calderón tropical que se obtuvieron a partir de biopsias de animales vivos y de necropsias de animales que han quedado varados en las costas canarias (Hildebrandt, 2002). El ADN se extrajo mediante el método del fenol-cloroformo de alto peso molecular (Blin & Stafford, 1976). Para ambas especies se amplificaron los NADH5 y COI, mediante P.C.R. (Saiki *et al.* en 1985), para los cuales fueron diseñados cebadores genéricos con el programa *Primer Premier* (v4.04). Las condiciones de amplificación para ambos genes fueron las descritas por Hildebrandt (2002). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y purificadas mediante columnas MicroSpin S400HR (Amersham-Pharmacia). La concentración de los ADNs y sus tamaños, en pares de bases, fueron determinados mediante un marcador (λ cortado con HindIII) y un análisis de regresión con el programa *Gelwork ID*. Los fragmentos se secuenciaron a mediante el método de Sanger (1981), tanto por secuenciación manual de tinción de plata (*Silver Sequence DNA*

Sequencing Reagents, Promega) como por secuenciación automática (*ABI Prism® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Applied Biosystems). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) y el número de haplotipos y los lugares polimórficos se identificaron con el programa DNASP (v. 3.53) (Rozas & Rozas, 1999). Para cada gen se estimó la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) según las fórmulas de Nei (1987). El análisis cladístico se realizó utilizando el programa MEGA (v.2.1) (Kumar *et al.* 2001), mientras que las distancias se calcularon por el método de Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969). Para la representación de los árboles filogenéticos se utilizó el método *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987). La fiabilidad del árbol inferido se contrastó mediante el *Bootstrap Test* (Felsenstein, 1985), con 1000 réplicas, según el cual una rama se considera estadísticamente significativa cuando su valor *bootstrap* es mayor o igual al 95%.

RESULTADOS

Gen NADH5

Calderón tropical. Se obtuvieron 10 secuencias de calderón tropical para este gen, del que se secuenciaron unos 608 pb. Se encontraron 8 haplotipos únicos y 2 repetidos. Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 0 a 81 mutaciones (0%-13,6%). Aparecieron 101 posiciones nucleotídicas polimórficas, lo que representa un 10.42% de lugares variables. En estas 101 bases hubo 103 mutaciones (78 transiciones y 25 transversiones) y 11 deleciones. La diversidad haplotípica fue $h=0,956$, mientras que la diversidad nucleotídica promedio fue $\pi=0,065$, que al ubicarla en intervalos de 30 bases a lo largo de la secuencia, se apreció una distribución muy variable con máximo de $\pi=0,1392$ en el intervalo comprendido entre las bases 31 y 60.

Delfín mular. Se obtuvieron 18 secuencias de delfín mular para este gen, del que se secuenciaron 622 pares de bases. Todos los haplotipos encontrados fueron únicos, por lo que la diversidad haplotípica fue $h=1$. Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 2 a 102 mutaciones (0,3%-16,7%), y aparecieron 181 posiciones nucleotídicas polimórficas, lo que representó un 29,1% de lugares variables. En estas bases hubo 198 mutaciones (128 transiciones y 70 transversiones) y 11 deleciones. La diversidad nucleotídica promedio fue $\pi=0,096$, que al representarla en intervalos de 30 bases, se observó, al igual que en el calderón tropical, que el intervalo comprendido entre las bases 31-60 mostró uno de los valores máximos ($\pi=0,178$).

Gen COI

Calderón tropical. Se obtuvieron 11 secuencias de calderón tropical para este gen, mediante el análisis de 700pb. Todos los haplotipos fueron únicos, con una diversidad haplotípica de $h=1$, y las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 2 a 83 mutaciones (0,3%-11,9%). Aparecieron 112 posiciones nucleotídicas polimórficas, lo que representó un 16% de lugares variables. En estas bases hubo 118 mutaciones (80 transiciones y 38 transversiones) y 1 deleción. La diversidad nucleotídica promedio fue $\pi=0,039$, que al representarla en intervalos de 30 bases se observó una distribu-

ción asimétrica, estando la mayor de la variabilidad al final de la secuencia, entre las bases 600 y 700.

Delfín mular. Se obtuvieron 13 secuencias de delfín mular para dicho gen, del que se secuenciaron 630pb. Todos los haplotipos volvieron a ser únicos, dando por tanto una diversidad haplotípica de $h=1$. Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 1 a 77 mutaciones (0,2%-12,5%). Aparecieron 136 posiciones nucleotídicas polimórficas, lo que representó un 21,59% de lugares variables. En estas bases hay 144 mutaciones (101 transiciones y 43 transversiones) y 12 deleciones. La diversidad nucleotídica promedio fue de $\pi=0,058$, y cuya representación en intervalos de 30 bases puso de manifiesto, al igual que sucedió para el calderón tropical, un valor máximo en el intervalo comprendido entre las bases 271 y 300.

Filogenia

Para el análisis cladístico de ambas especies se utilizaron sólo las muestras en las que se secuenciaron tanto el gen COI como el gen NADH5, a fin de evitar el efecto de la muestra en los árboles filogenéticos inferidos para cada gen, es decir, los factores históricos. Exactamente fueron 8 especímenes de calderón tropical y otros 8 de delfín mular. Además, en los dos genes, se utilizó como *outgroup* una secuencia de rorcual común (*Balaenoptera physalus*) descrita por Hildebrandt (2002), con el fin de situar las posiciones relativas de las especies y dar mayor consistencia a las reconstrucciones históricas.

En la Figura 1, se presenta el cladograma que reconstruye las relaciones genéticas de ambas especies para el gen COI, donde se aprecia la existencia de dos *clusters*, uno por especie, con unos valores *bootstrap* superiores al 95%. Contrariamente, para el gen NADH5 las relaciones filogenéticas quedan mal definidas puesto que los haplotipos quedan agrupados en tres *clusters*, dentro de los cuales las relaciones no atienden a nivel de especie (Figura 2). Así, en dos de los cluster aparecen tanto haplotipos de calderón tropical como de delfín mular. Aunque en la comparación de ambos cladogramas hay relaciones estables, por ejemplo la relación estrecha entre los haplotipos G2, G3, G5, G8 y G9 (con valores *bootstrap* superiores al 95%), las relaciones no atienden a criterios de especie, llegando incluso a relacionar un ejemplar de delfín mular con el haplotipo de rorcual común antes que con haplotipos de su misma especie.

Todo ello pone de relieve que en cetáceos, el gen COI reconstruye mejor las relaciones intra e interespecíficas que el gen NADH5, quizás como consecuencia de que el gen NADH5 muestra un mayor grado de saturación que el COI, lo que queda reflejado por su mayor diversidad nucleotídica. De hecho, para el NADH en ambas especies se obtuvo casi el doble de π , lo que concuerda con los datos encontrados en otras especies (Ferris *et al.*, 1983; Solignac *et al.*, 1986; López *et al.*, 1997). Es más, el efecto de la magnitud de la diversidad nucleotídica del NADH5 enmascara el poder de resolución del gen COI, ya que la consideración de ambos en un análisis filogenético no esclarece en absoluto las relaciones intra e interespecíficas, aún cuando los cladogramas son más sensibles a las longitudes de los genes secuenciados que al número de muestra utilizadas.

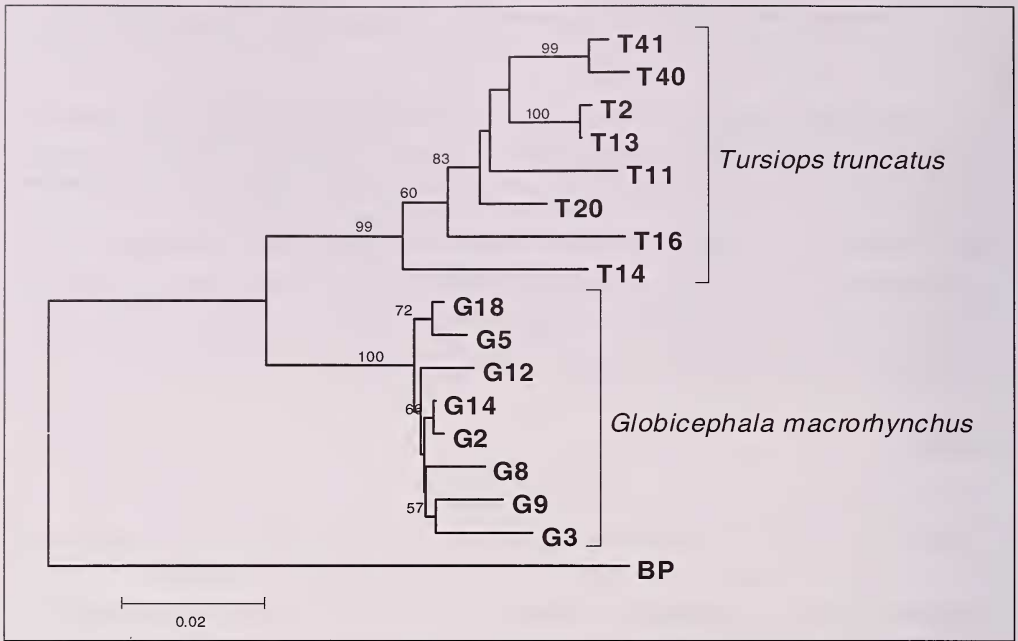


Figura 1.- Cladograma del COI para haplotipos de calderón tropical (Gi), delfín mular (Ti) y un ejemplar de rorcual común (BP).

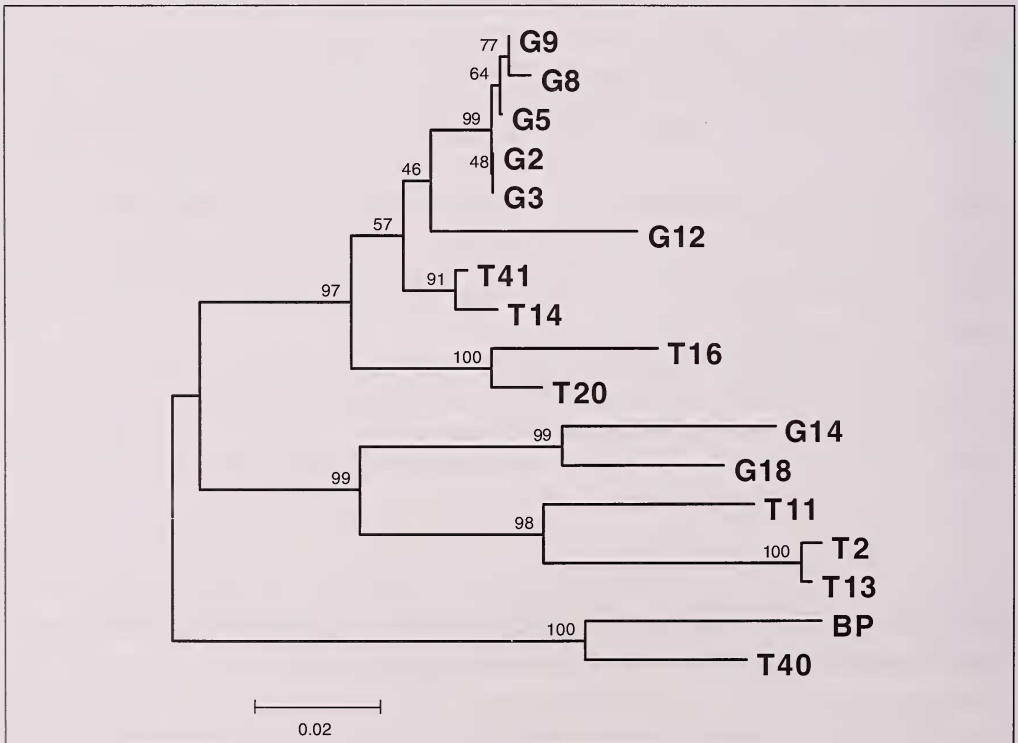


Figura 2.- Cladograma del NADH5 para halotipos de calderón tropical (Gi), delfín mular (Ti) y un ejemplar de rorcual común (BP).

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

1. La Revista de la Academia Canaria de Ciencias publica **artículos de investigación** de Biología, Física, Matemáticas o Química. También publica trabajos sobre **Historia y Filosofía de la Ciencia** y también de **Divulgación Científica** referidos a las áreas anteriormente mencionadas.
2. Los autores enviarán tres copias de los originales al director de la revista:
Prof. N. Hayek
Revista de la Academia Canaria de Ciencias
Fac. de Matemáticas
Universidad de La Laguna
38271 - La Laguna, Tenerife
España

Los trabajos serán sometidos a un proceso de revisión a cargo de especialistas o referees designados por el comité editorial de la Revista. En caso de aceptación para su publicación en la Revista, los autores enviarán un disquete o un CD con los ficheros correspondientes.

3. Puesto que la Revista utiliza el sistema *offset* de edición, los autores deberán cuidar la confección de los originales de los trabajos de acuerdo con las presentes instrucciones. Por ello, se aconseja emplear un procesador de texto, preferentemente WORD o LATEX, con letra de tamaño 12 y a espacio y medio entre líneas, y se debe utilizar papel tamaño DIN A 4, dejando márgenes de 3 centímetros, siguiendo el siguiente esquema:
 - a) **TÍTULO DEL TRABAJO**, en **negrita**, centrado y en mayúsculas.
 - b) Apellidos y nombres de los autores, centrado y en minúsculas.
 - c) Institución donde se ha realizado el trabajo, dirección postal y dirección electrónica (centrado y en minúsculas).
 - d) Resumen del trabajo con una extensión máxima de 200 palabras (en minúsculas y subrayado).
 - e) Palabras clave (entre tres y cinco).
 - f) Abstract en inglés y keywords (las correspondientes traducciones de los apartados d y e anteriores).
 - g) El texto del trabajo será dividido en secciones. Los encabezamientos de cada sección, numerados correlativamente, se escribirán en letras minúsculas en **negrita**. Si hubiera subsecciones, se enumerarán en la forma 1.1, 1.2, ..., 2.1, 2.2,.... escribiéndose los encabezamientos en *cursiva*.
 - h) Las fotos y láminas en color se presentarán en CD y montadas en papel fotográfico o, en su defecto, en diapositivas.
 - i) La bibliografía se presentará ordenada numéricamente o por orden alfabético del primer autor. Si se trata de un artículo, deberá aparecer el autor o autores, el año de publicación, el título entrecomillado, la revista, el número y las páginas. Si se trata de un libro, debe incluirse el autor o autores, el año, el título en cursiva y la editorial.
4. La extensión de los trabajos será, como máximo, de 16 páginas, en el caso de artículos de investigación, y de 25 páginas en el caso de trabajos de divulgación y de Historia y Filosofía de la Ciencia.
- 5) En caso de ser publicado, los autores recibirán 20 separatas del trabajo.